

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-283814  
 (43)Date of publication of application : 03.10.2003

(51)Int.Cl. H04N 1/393  
 G06T 3/40  
 H04N 5/262

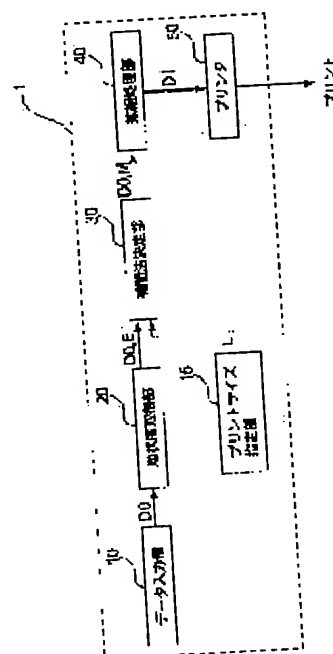
(21)Application number : 2002-085069 (71)Applicant : FUJI PHOTO FILM CO LTD  
 (22)Date of filing : 26.03.2002 (72)Inventor : KAGAYA ATSUSHI

## (54) IMAGE PROCESSING APPARATUS AND PROGRAM

## (57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To improve a picture quality of a secondary image by scaling processing of image data.

SOLUTION: An interpolation method determining part 30 determines an interpolation method M of scaling processing to photograph image data D0 on the basis of the granularity E of the photograph image data D0 acquired by a granularity acquiring part 20 and a scaling magnification S of the scaling processing to be applied to the photograph image data D0. A scaling processing part 40 applies the scaling processing to the image data D0 by using the determined interpolation method M to obtain image data D1. A printer 50 prints out the image data D1 to obtain a print.



## LEGAL STATUS

08.03.2004

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2002-85069

(P2002-85069A)

(43)公開日 平成14年3月26日(2002.3.26)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テームト <sup>*</sup> (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 9/10	4 B 0 2 4
9/10		C 1 2 P 19/26	4 B 0 5 0
C 1 2 P 19/26		C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B 0 6 4

審査請求 未請求 請求項の数8 O L (全 15 頁)

(21)出願番号 特願2000-273835(P2000-273835)

(22)出願日 平成12年9月8日(2000.9.8)

(71)出願人 000195524

生化学工業株式会社

東京都中央区日本橋本町2丁目1番5号

(71)出願人 597130236

古川 鋼一

愛知県名古屋市北区名城3丁目1-5 名城住宅5-402

(72)発明者 古川 鋼一

愛知県名古屋市北区名城3丁目1-5 名城住宅5棟402

(72)発明者 岡島 徹也

愛知県名古屋市熱田区青池町2-41 アク  
トピア白鳥公園605号

最終頁に続く

(54)【発明の名称】  $\beta$  1, 3-N-アセチルガラクトサミン転移酵素の製造方法

(57)【要約】 (修正有)

【課題】 G b 4 合成酵素をコードするDNAを単離し、その利用法を提供する。

【解決手段】 特定のDNAを細胞に導入し、次いで該細胞を生育させて $\beta$  1, 3-N-アセチルガラクトサミン転移酵素を発現させ、これを採取する工程を少なくとも含む、酵素活性を維持している $\beta$  1, 3-N-アセチルガラクトサミン転移酵素の製造方法。

【整理番号】 J200002500

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 下記 (a) 又は (b) に示す DNA を細胞に導入し、次いで該細胞を生育させて  $\beta$  1, 3-N-アセチルガラクトサミン転移酵素を発現させ、これ採取する工程を少なくとも含む、 $\beta$  1, 3-N-アセチルガラクトサミン転移酵素の製造方法。

(a) 配列番号 1 に記載の塩基配列のうち、塩基番号 109～1101 からなる塩基配列を含む DNA。

(b) 配列番号 1 に記載の塩基配列もしくは同塩基配列に相補的な塩基配列又はこれらの塩基配列の一部を有する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA。

【請求項 2】 前記 (b) に示す DNA が、N-アセチルガラクトサミン供与体から、受容体である Gb3 糖鎖中のガラクトース残基の C3 位に、N-アセチルガラクトサミン残基を転移する酵素活性を有するポリペプチドをコードしていることを特徴とする、請求項 1 に記載の製造方法。

【請求項 3】 以下の (A) 又は (B) のポリペプチド、N-アセチルガラクトサミン供与体および Gb3 糖鎖を接触させて酵素反応させる工程を少なくとも含む、Gb4 糖鎖の製造方法。

(A) 配列番号 2 のアミノ酸番号 1～331 で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド。

(B) アミノ酸配列 (A) において、1 もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入または転位したアミノ酸配列からなり、かつ N-アセチルガラクトサミン供与体から、受容体である Gb3 糖鎖中のガラクトース残基の C3 位に、N-アセチルガラクトサミン残基を転移する酵素活性を有するポリペプチド。

【請求項 4】 下記 (a) 又は (b) に示す DNA を Gb3 糖鎖発現細胞に導入し、次いで該細胞を生育させる工程を少なくとも含む、Gb4 糖鎖の製造方法。

(a) 配列番号 1 に記載の塩基配列のうち、塩基番号 109～1101 からなる塩基配列を含む DNA。

(b) 配列番号 1 に記載の塩基配列もしくは同塩基配列に相補的な塩基配列又はこれらの塩基配列の一部を有する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA。

【請求項 5】 前記 (b) に示す DNA が、N-アセチルガラクトサミン供与体から、受容体である Gb3 糖鎖中のガラクトース残基の C3 位に、N-アセチルガラクトサミン残基を転移する酵素活性を有するポリペプチドをコードしていることを特徴とする、請求項 4 に記載の製造方法。

【請求項 6】 下記 (a) 又は (b) に示す DNA と、フォスマン抗原合成酵素をコードする cDNA とを共に Gb3 糖鎖発現細胞に導入し、次いで該細胞を生育させる工程を少なくとも含む、フォスマン抗原糖鎖の製

造方法。

(a) 配列番号 1 に記載の塩基配列のうち、塩基番号 109～1101 からなる塩基配列を含む DNA。

(b) 配列番号 1 に記載の塩基配列もしくは同塩基配列に相補的な塩基配列又はこれらの塩基配列の一部を有する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA。

【請求項 7】 前記 (b) に示す DNA が、N-アセチルガラクトサミン供与体から、受容体である Gb3 糖鎖中のガラクトース残基の C3 位に、N-アセチルガラクトサミン残基を転移する酵素活性を有するポリペプチドをコードしていることを特徴とする、請求項 6 に記載の製造方法。

【請求項 8】  $\beta$  1, 3-N-アセチルガラクトサミン転移酵素の発現のための、下記 (a) 又は (b) に示す DNA の使用。

(a) 配列番号 1 に記載の塩基配列のうち、塩基番号 109～1101 からなる塩基配列を含む DNA。

(b) 配列番号 1 に記載の塩基配列もしくは同塩基配列に相補的な塩基配列又はこれらの塩基配列の一部を有する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、 $\beta$  1, 3-N-アセチルガラクトサミン転移酵素をコードする DNA を利用した該酵素の製造方法、該酵素を利用したグロボシド (Gb4) をはじめとする各種糖脂質の糖鎖の製造方法等に関する。

【0002】

【従来の技術】グリコスフィンゴ脂質は糖転移酵素の連続した作用により合成される。ラクトシルセラミド (LacCer; Gal $\beta$ 1,4Glc-Cer) に、異なる 3 種の糖の内の一つが付加されると、3 種の主要な糖脂質系、すなわち、ラクト/ネオラクト系 ( $\beta$ 1,3-N-アセチルグルコサミンが付加)、ガングリオ系 ( $\alpha$ 2,3-シアル酸が付加)、およびグロボ系 ( $\alpha$ 1,4-ガラクトースが付加) のいずれか 1 種となる。グロボ系糖脂質の一種であるグロボトリアオシルセラミド (Gb3; Gal $\alpha$ 1,4Gal $\beta$ 1,4Glc-Cer) は、LacCer にガラクトースが転移して  $\alpha$ 1,4-結合することにより生成する。この反応を触媒する Gb3/CD77 合成酵素 ( $\alpha$ 1,4-ガラクトース転移酵素) の遺伝子は、本発明者らによって既にクローニングされている (J. Biol. Chem., 275(20), p15152-15156 (2000))。

【0003】一方、グロボ系糖脂質の一種であるグロボシド (Gb4; GalNAc $\beta$ 1,3Gal $\alpha$ 1,4Gal $\beta$ 1,4Glc-Cer) は、Gb3 に N-アセチルガラクトサミンが転移して  $\beta$ 1,3-結合することにより生成するが、この反応を触媒する Gb4 合成酵素 ( $\beta$ 1,3-N-アセチルガラクトサミン転移酵素) の遺伝子のクローニングについては報告されてい

ない。

【0004】フォルスマン抗原(GalNAc $\alpha$ 1,3GalNAc $\beta$ 1,3Gal $\alpha$ 1,4Gal $\beta$ 1,4Glc-Cer)は、G b 4 にN-アセチルガラクトサミンが転移して $\alpha$ 1,3-結合することにより生成する。この反応を触媒するフォルスマン抗原合成酵素( $\alpha$ 1,3-N-アセチルガラクトサミン転移酵素)の遺伝子のクローニングは既に報告されている(J. Biol. Chem., 274(41), p29390-29398 (1999))。

【0005】従って、これらグロボ系糖脂質の合成酵素のなかでクローニングされていないのは、G b 4 合成酵素の遺伝子のみである。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、G b 4 合成酵素、すなわち $\beta$ 1,3-N-アセチルガラクトサミン転移酵素をコードするDNAを単離し、さらにその利用法を提供することを課題とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討を重ねた結果、 $\beta$ 1,3-N-アセチルガラクトサミン転移酵素をコードするDNAを単離してその塩基配列を明らかにし、さらにこのDNAが、 $\beta$ 1,3-N-アセチルガラクトサミン転移酵素を発現することを確認して、本発明を完成した。

【0008】すなわち本発明は、下記(a)又は(b)に示すDNAを細胞に導入し、次いで該細胞を生育させて $\beta$ 1,3-N-アセチルガラクトサミン転移酵素を発現させ、これを採取する工程を少なくとも含む、 $\beta$ 1,3-N-アセチルガラクトサミン転移酵素(G b 4 合成酵素)の製造方法(以下、「本発明酵素製造方法」という)を提供する。

(a) 配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基番号109～1101からなる塩基配列を含むDNA。

(b) 配列番号1に記載の塩基配列もしくは同塩基配列に相補的な塩基配列又はこれらの塩基配列の一部を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA。ここで(b)に示すDNAは、N-アセチルガラクトサミン供与体から、受容体であるG b 3 糖鎖中のガラクトース残基のC 3 位に、N-アセチルガラクトサミン残基を転移する酵素活性を有するポリペプチドをコードしているものであることが好ましい。

【0009】また本発明は、以下の(A)又は(B)のポリペプチド、N-アセチルガラクトサミン供与体およびG b 3 糖鎖を接触させて酵素反応させる工程を少なくとも含む、G b 4 糖鎖の製造方法(以下、「本発明G b 4 製造方法1」という)を提供する。

(A) 配列番号2のアミノ酸番号1～331で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド。

(B) アミノ酸配列(A)において、1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入または転位したアミノ酸配列からなり、かつN-アセチルガラクトサミン供与体か

ら、受容体であるG b 3 糖鎖中のガラクトース残基のC 3 位に、N-アセチルガラクトサミン残基を転移する酵素活性を有するポリペプチド。

【0010】また本発明は、下記(a)又は(b)に示すDNAをG b 3 糖鎖発現細胞に導入し、次いで該細胞を生育させる工程を少なくとも含む、G b 4 糖鎖の製造方法(以下、「本発明G b 4 製造方法2」という)を提供する。

(a) 配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基番号109～1101からなる塩基配列を含むDNA。

(b) 配列番号1に記載の塩基配列もしくは同塩基配列に相補的な塩基配列又はこれらの塩基配列の一部を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA。ここで(b)に示すDNAは、N-アセチルガラクトサミン供与体から、受容体であるG b 3 糖鎖中のガラクトース残基のC 3 位に、N-アセチルガラクトサミン残基を転移する酵素活性を有するポリペプチドをコードしているものであることが好ましい。

【0011】また本発明は、下記(a)又は(b)に示すDNAと、フォルスマン抗原合成酵素をコードするc DNAとを共にG b 3 糖鎖発現細胞に導入し、次いで該細胞を生育させる工程を少なくとも含む、フォルスマン抗原糖鎖の製造方法(以下、「本発明フォルスマン製造方法」という)を提供する。

(a) 配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基番号109～1101からなる塩基配列を含むDNA。

(b) 配列番号1に記載の塩基配列もしくは同塩基配列に相補的な塩基配列又はこれらの塩基配列の一部を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA。ここで(b)に示すDNAは、N-アセチルガラクトサミン供与体から、受容体であるG b 3 糖鎖中のガラクトース残基のC 3 位に、N-アセチルガラクトサミン残基を転移する酵素活性を有するポリペプチドをコードしているものであることが好ましい。

【0012】また本発明は、 $\beta$ 1,3-N-アセチルガラクトサミン転移酵素(G b 4 合成酵素)の発現のための、下記(a)又は(b)に示すDNAの使用(以下、「本発明使用」という)を提供する。

(a) 配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基番号109～1101からなる塩基配列を含むDNA。

(b) 配列番号1に記載の塩基配列もしくは同塩基配列に相補的な塩基配列又はこれらの塩基配列の一部を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA。

【0013】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。本明細書において共通して用いる略号は以下の通りである。

Gal : ガラクトース

Glc : グルコース

(4)

5

GalNAc : N-アセチルガラクトサミン

Cer : セラミド

LacCer : ラクトシルセラミド (Gal  $\beta$  1, 4Glc-Cer)Gb3 : グロボトリアオシルセラミド (Gal  $\alpha$  1, 4Gal  $\beta$  1, 4Glc-Cer)

Gb3糖鎖 : Gb3の糖鎖 (Gal  $\alpha$  1, 4Gal  $\beta$  1, 4Glc)。 「Gb3糖鎖」といった場合、Gb3糖鎖を有しているあらゆる物質 (例えば、Gb3自体 (Gb3糖鎖にCerが結合した物質) 等) も包含する。

Gb4 : グロボシド (GalNAc  $\beta$  1, 3Gal  $\alpha$  1, 4Gal  $\beta$  1, 4Glc-Cer) 10

Gb4糖鎖 : Gb4の糖鎖 (GalNAc  $\beta$  1, 3Gal  $\alpha$  1, 4Gal  $\beta$  1, 4Glc)。 「Gb4糖鎖」といった場合、Gb4糖鎖を有しているあらゆる物質 (例えば、Gb4自体 (Gb4糖鎖にCerが結合した物質) 等) も包含する。

フォルスマン抗原 : GalNAc  $\alpha$  1, 3GalNAc  $\beta$  1, 3Gal  $\alpha$  1, 4Gal  $\beta$  1, 4Glc-Cer

フォルスマン抗原糖鎖 : フォルスマン抗原の糖鎖 (GalNAc  $\alpha$  1, 3GalNAc  $\beta$  1, 3Gal  $\alpha$  1, 4Gal  $\beta$  1, 4Glc)。 「フォルスマン抗原糖鎖」といった場合、フォルスマン抗原糖鎖を有しているあらゆる物質 (例えば、フォルスマン抗原自体 (フォルスマン抗原糖鎖にCerが結合した物質) 等) も包含する。 20

GM3 : SA  $\alpha$  2, 3Gal  $\beta$  1, 4Glc-Cer (SAはシアル酸)

GD3 : SA  $\alpha$  2, 8SA  $\alpha$  2, 3Gal  $\beta$  1, 4Glc-Cer (SAはシアル酸)

UDP : ウリジン-5'-ジリン酸

なお、ガングリオシドの命名法は、Svennerholm (J. Neurochem. 10, p455-463, (1963)) に従った。

【0014】また本明細書において、N-アセチルガラクトサミン供与体から、受容体であるGb3糖鎖中のガラクトース残基のC3位に、N-アセチルガラクトサミン残基を転移して $\beta$ 1,3-結合を形成する反応を触媒する酵素を、「 $\beta$ 1,3-N-アセチルガラクトサミン転移酵素」という。本明細書において、「Gb4合成酵素」と表記することもある。 30

【0015】また、N-アセチルガラクトサミン供与体から、受容体であるGb3糖鎖中のガラクトース残基のC3位に、N-アセチルガラクトサミン残基を転移して $\beta$ 1,3-結合を形成する酵素活性を、「 $\beta$ 1,3-N-アセチルガラクトサミン転移酵素活性」という。本明細書において、「Gb4合成酵素活性」と表記することもある。 40

【0016】<1>本発明酵素製造方法  
本発明酵素製造方法は、下記(a)又は(b)に示すDNAを細胞に導入し、次いで該細胞を生育させてGb4合成酵素を発現させ、これを採取する工程を少なくとも含む、Gb4合成酵素の製造方法である。

(a) 配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基番号109~1101からなる塩基配列を含むDNA。

(b) 配列番号1に記載の塩基配列もしくは同塩基配列 50

に相補的な塩基配列又はこれらの塩基配列の一部を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA。

【0017】本発明酵素製造方法により製造されるGb4合成酵素は、酵素活性を維持しているものが好ましい。(a)について、配列番号1における塩基番号109~1101からなる部分はGb4合成酵素をコードしている領域であることから、この領域を含むDNAを細胞に導入し、次いで該細胞を生育させることにより、Gb4合成酵素を発現させることができる。

【0018】また(b)について、配列番号1に記載の塩基配列もしくは同塩基配列に相補的な塩基配列又はこれらの塩基配列の一部を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAも、上記(a)と同様の構造・機能・作用等を有していると考えられることから、上記(a)に代えて上記(b)のDNAを用いることができる。すなわち、上記(b)のDNAは、Gb4合成酵素活性を有するポリペプチドをコードしていると考えられ、このようなDNAも、上記(a)のDNAと同様に用いることができる。よって(b)に示すDNAは、Gb4合成酵素活性を有するポリペプチドをコードしているものであることが好ましい。

【0019】ここで「ストリンジェントな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう (Sambrook, J. et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)等参照)。「ストリンジェントな条件」として具体的には、50%ホルムアミド、4×SSC、50mM HEPES (pH7.0)、10×Denhardt's solution、100 $\mu$ g/ml サケ精子DNAを含む溶液中、42℃でハイブリダイズさせ、次いで室温で2×SSC、0.1% SDS溶液、50℃下で0.1×SSC、0.1% SDS溶液で洗浄する条件が挙げられる。

【0020】Gb4合成酵素活性は、例えば後記実施例に示すように、N-アセチルガラクトサミン供与体としてUDP-GalNAcを用い、Gb3糖鎖へのGalNAcの転移反応を利用した測定方法を用いることによって測定できる。

【0021】上記(a)又は(b)のDNAは、例えば後述の実施例に記載した方法で製造することができ、この方法で製造されたものを用いることが好ましい。またこれらのDNAのうち、(a)のDNAを用いることが好ましい。なお、遺伝暗号の縮重による異なった塩基配列を有するDNAを用いてもよいことは、当業者であれば容易に理解されるところである。

【0022】上記(a)又は(b)に示すDNAを細胞に導入し、次いでこの細胞(形質転換細胞)を生育させてGb4合成酵素を発現させ、これを採取することにより、酵素活性を維持しているGb4合成酵素を製造することができる。DNAは、直接発現させてもよいし、G

(5)

7

b 4 合成酵素活性を維持している限りにおいて他のポリペプチドとの融合ポリペプチドとして発現させてもよい。また、DNAは全長を発現させてもよいし、G b 4 合成酵素活性を維持している限りにおいて部分ペプチドとして発現させてもよい。

【0023】宿主細胞は、上記(a)又は(b)に示されたDNA又はこれらDNAを組み込んだ組換えベクターの機能を発揮できる限りにおいて特に限定されず、動物細胞、植物細胞、微生物細胞(菌体)が包含され、エシエリヒア・コリ等の原核細胞や、哺乳類細胞等の真核細胞が具体的に例示される。エシエリヒア・コリなどの原核細胞を用いた場合は、DNAの発現によって生じるポリペプチドに糖鎖の付加が起らないため、糖鎖が付加されていないG b 4 合成酵素を得ることが可能であり、また、哺乳類細胞等の真核細胞を用いた場合は、DNAの発現によって生じる酵素に糖鎖が付加しうるため、糖鎖を含むG b 4 合成酵素の形態で得ることも可能である。

【0024】上記(a)又は(b)に示されるDNAを導入する宿主細胞としてより具体的には、マウスの線維芽細胞であるL細胞や、このL細胞をSV40のラージT抗原とGb3/CD77合成酵素をコードするcDNAとでトランスフェクトして得られる1 B 9細胞が例示される。

【0025】上記(a)又は(b)に示すDNAを細胞(宿主細胞)に導入するには、例えば、DNAを適当なベクターに組み込んで組換えベクターを作製し、この組換えベクターを用いてDNAを宿主細胞に導入すればよい。ベクターとしては、発現ベクターが好ましい。具体的には、pcDNA3.1発現ベクター(インビトロジェン社)等が挙げられる。

【0026】DNAを細胞に導入する方法としては、例えば、DEAE-デキストラン法(J. Biol. Chem., 267, p12082-12089 (1992))を用いてトランスフェクションを行う方法が例示される。

【0027】細胞の生育は、DNAを導入することによって形質転換された細胞を好適な培地中で培養することにより行っても良く、また、形質転換された細胞を生体内で生育させてもよい。

【0028】発現した酵素は、形質転換細胞の培養物から採取できるが、酵素が形質転換細胞の細胞質中又は膜画分に生成、蓄積する場合は形質転換細胞から、また、培地中に蓄積する場合は、培地から、採取する。さらに、酵素が発現した細胞を利用する場合は、形質転換細胞又はその処理物をそのまま、又は適当な固相に結合し、もしくはゲルに包括させ、固定化して、利用することができる。なお培養物には、培地および当該培地中で培養された形質転換細胞が包含される。

【0029】培養物からの酵素の採取は、酵素についての公知の抽出、精製方法によって行うことができる。

【0030】酵素の抽出方法として具体的には、窒素キ

ャピテーション装置を用いる方法、ホモジナイズ、ガラスビーズミル法、音波処理、浸透ショック法、凍結融解法等の細胞破碎による抽出、界面活性剤抽出、またはこれらの組み合わせ等の処理操作が挙げられる。

【0031】DNAとして、前記(a)で示されるDNAを1 B 9細胞で発現させると、G b 4 合成酵素は細胞の膜画分に局在する。またDNAを、G b 4 合成酵素のポリペプチド又はその一部を欠くポリペプチドと他のポリペプチドとの融合タンパク質として、可溶性の形態で発現させると、同融合タンパク質は細胞質中に局在し得る。また、DNAを、G b 4 合成酵素のポリペプチド又はその一部を欠くポリペプチドと分泌シグナルとの融合タンパク質として発現させると、培地中に分泌し得る。尚、G b 4 合成酵素のポリペプチドの一部を欠くポリペプチドをコードするDNAは、そのように設計されたプライマーを用いてPCR(ポリメラーゼ連鎖反応法)を行うことにより、ヒト由来mRNAもしくはcDNAライブラリー、または染色体DNAから単離することができる。

【0032】細胞又は培地から抽出されるG b 4 合成酵素の精製方法として具体的には、例えば硫酸アンモニウム(硫安)や硫酸ナトリウム等による塩析、遠心分離、透析、限外濾過法、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、ゲルろ過法、ゲル浸透クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、電気泳動法等や、これらの組み合わせ等の処理操作が挙げられる。なおG b 4 合成酵素は、必ずしも完全精製する必要もなく、酵素活性を維持している限りにおいて部分精製に止めてもよい。

【0033】このようにして得られたG b 4 合成酵素のアミノ酸配列、分子サイズ、作用、基質特異性等を分析することによって、G b 4 合成酵素の製造が確認できる。

【0034】<2>各種グロブ系糖脂質の製造方法

(1)本発明G b 4 製造方法1

本発明G b 4 製造方法1は、以下の(A)又は(B)のポリペプチド、N-アセチルガラクトサミン供与体およびG b 3 糖鎖を接触させて酵素反応させる工程を少なくとも含む、G b 4 糖鎖の製造方法である。

(A)配列番号2のアミノ酸番号1~331で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド。

(B)アミノ酸配列(A)において、1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入または転位したアミノ酸配列からなり、かつG b 4 合成酵素活性を有するポリペプチド。

【0035】(A)について、配列番号2のアミノ酸番号1~331で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドは、G b 4 合成酵素のポリペプチドそのものであり、触媒部位を含んでいる。したがって、このポリペプチド、N-アセチルガラクトサミン供与体およびG b 3

糖鎖を接触させて酵素反応させることにより、G b 4 糖鎖を製造することができる。

【0036】また (B) について、「1 もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入または転位したアミノ酸配列からなり、かつ G b 4 合成酵素活性を有するポリペプチド」とは、N-アセチルガラクトサミン供与体から、受容体である G b 3 糖鎖中のガラクトース残基の C 3 位に、N-アセチルガラクトサミン残基を転移する酵素活性 ( $\beta$  1, 3-N-アセチルガラクトサミン転移酵素活性) を実質的に害さない 1 もしくは数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入又は転位を有していてもよいポリペプチドを意味する。

【0037】すなわち、天然に存在するポリペプチドには、それをコードする DNA の多形や変異の他、生成後のポリペプチドの細胞内および精製中の修飾反応などによってそのアミノ酸配列中にアミノ酸の置換、欠失、挿入又は転位等の変異が起こりうるが、それにもかかわらず変異を有しないポリペプチドと実質的に同等の生理、生物学的活性を示すものがあることが知られている。このように構造的に若干の差違があってもその機能については大きな違いが認められないものも、ここで用いられるポリペプチドに包含される。人為的にポリペプチドのアミノ酸配列に上記のような変異を導入した場合も同様であり、この場合にはさらに多種多様の変異体を作製することが可能である。例えば、ヒトインターロイキン 2 (IL-2) のアミノ酸配列中の、あるシステイン残基をセリンに置換したポリペプチドがインターロイキン 2 活性を保持することが知られている (Science, 224, 1431 (1984))。また、ある種のポリペプチドは、活性には必須でないペプチド領域を有していることが知られている。例えば、細胞外に分泌されるポリペプチドに存在するシグナルペプチドや、プロテアーゼの前駆体等に見られるプロ配列などがこれにあたり、これらの領域のほとんどは翻訳後、または活性型ポリペプチドへの転換に際して除去される。このようなポリペプチドは、一次構造上は異なった形で存在しているが、最終的には同等の機能を有するポリペプチドである。したがってこのようなポリペプチドも、上記 (A) のポリペプチドと同様に用いることができる。

【0038】なお本明細書における「数個のアミノ酸」とは、G b 4 合成酵素活性が失われない程度の変異を起こしてもよいアミノ酸の数を示し、例えば 400 アミノ酸残基からなるポリペプチドの場合、2~20 程度、好ましくは 2~10、より好ましくは 2~5 以下の数を示す。

【0039】G b 4 合成酵素活性は、例えば後記実施例に示すように、N-アセチルガラクトサミン供与体として UDP-GalNAc を用い、G b 3 糖鎖への GalNAc の転移反応を利用した測定方法を用いることによって測定できる。よって当業者であれば、Gb4 合成酵素活性の有無を指標

として、該活性を実質的に害さない 1 つ以上のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入又は転位を容易に選択することができる。

【0040】上記 (A) 又は (B) のポリペプチドは、例えば本発明酵素製造方法により製造することができ、この方法で製造されたものを用いることが好ましい。またこれらのポリペプチドのうち、(A) のポリペプチドを用いることが好ましい。ここで用いる「N-アセチルガラクトサミン供与体」としては、UDP-GalNAc 等の糖ヌクレオチド化した GalNAc が例示され、かつ好ましい。この供与体は、目的に応じて放射性標識等されていてもよく、例えば UDP- $[^3\text{H}]$ GalNAc 等を用いてもよい。

【0041】G b 3 糖鎖は、ここでは GalNAc の受容体として用いている。G b 3 糖鎖は市販のものを用いることもできる。上記の (A) 又は (B) のポリペプチド、N-アセチルガラクトサミン供与体および G b 3 糖鎖の接触のさせ方は、これら三者の分子が相互に接触して酵素反応が生ずる限りにおいて特に限定されない。例えば、これら三者が溶解した溶液中で接触させてもよい。また (A) 又は (B) のポリペプチドを適当な固相 (ビーズ等) に結合させた固定化酵素や、限外濾過膜、透析膜等を用いる膜型リアクター等を用いて連続的に酵素反応させることもできる。また、N-アセチルガラクトサミン供与体を再生 (合成) するバイオリアクターを組み合わせ用いてもよい。

【0042】酵素反応させる条件は、G b 4 合成酵素が作用する条件である限りにおいて特に限定されないが、中性 pH 付近 (例えば pH 6.5 程度) で反応させることが好ましく、該 pH 下で緩衝作用を有する緩衝液中で反応を行うことがより好ましい。またこの時の温度は、G b 4 合成酵素の活性が保持されている限りにおいて特に限定されないが、30~40℃ 程度が例示される。また G b 4 合成酵素の活性を増加させる物質がある場合にはその物質を添加してもよい。例えば  $\text{Mn}^{2+}$  等を共存させることが好ましい。反応時間は、用いる G b 3 糖鎖、GalNAc 供与体および G b 4 合成酵素の量、並びにその他の反応条件に応じて当業者が適宜決定することができる。

【0043】G b 4 合成酵素の作用により、GalNAc 供与体から G b 3 糖鎖に GalNAc が転移され、G b 4 糖鎖が生成する。生成した G b 4 糖鎖を回収するには、通常の糖鎖または糖脂質の分離、精製の手法を用いることができる。例えば吸着クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過法、ゲル浸透クロマトグラフィー、濾紙電気泳動法、濾紙クロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー、有機溶媒 (例えばアルコール、アセトン等) による分画、あるいはこれらの組み合わせ等の操作により行うことができる。このようにして得られた G b 4 糖鎖の、薄層クロマトグラフィー上での移動度や、G b 4 糖鎖に対するモノクローナル抗体への反応性等を分析することによ



て、G b 4糖鎖の製造が確認できる。

【0044】モノクローナル抗体を用いた確認は、公知の免疫学的手法を用いることができる。例えばイムノブロットリング法、標識化免疫測定法(例えばEIA法、ELISA法、ラジオイムノアッセイ法、蛍光イムノアッセイ法等)を用いることができる。もちろん、公知の糖鎖構造解析技術を用いて確認することもできる。

【0045】(2)本発明G b 4製造方法2

本発明G b 4製造方法2は、下記(a)又は(b)に示すDNAをG b 3糖鎖発現細胞に導入し、次いで該細胞を生育させる工程を少なくとも含む、G b 4糖鎖の製造方法である。

(a) 配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基番号109~1101からなる塩基配列を含むDNA。

(b) 配列番号1に記載の塩基配列もしくは同塩基配列に相補的な塩基配列又はこれらの塩基配列の一部を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA。

【0046】ここで(b)に示すDNAは、G b 4合成酵素活性を有するポリペプチドをコードしているものであることが好ましい。(a)又は(b)で示されるDNAの説明は、前記した「本発明酵素製造方法」における(a)又は(b)で示されるDNAと同じである。

【0047】宿主細胞は、G b 3糖鎖を発現する細胞である限りにおいて特に限定されないが、後述の実施例に示す1B9細胞が好ましい。

【0048】上記(a)又は(b)に示すDNAをG b 3糖鎖発現細胞に導入する方法、その際に用いるベクター、DNAが導入された細胞を生育させる方法等は、前記した「本発明酵素製造方法」と同様である。上記

(a)又は(b)に示すDNAをG b 3糖鎖発現細胞に導入し、次いで該細胞を生育させることにより、G b 4合成酵素が発現し、この作用によってG b 3糖鎖にGalNAcが転移して $\beta$ 1,3-結合が形成され、細胞の表面にG b 4糖鎖が発現する。

【0049】G b 4糖鎖の採取は、公知の糖鎖または糖脂質の抽出、精製方法によって行うことができる。

【0050】糖脂質の抽出方法として具体的には、メタノール、クロロホルム等による有機溶媒抽出、ホモジナイズ、音波処理等の細胞破碎による抽出、またはこれらの組み合わせ等の処理操作が挙げられる。培養物中の細胞に対してこのような抽出操作を行うことによりG b 4糖鎖を含有する抽出物を得ることができる。抽出液からのG b 4糖鎖の分離、精製は、通常の糖鎖または糖脂質の分離、精製の手法を用いることができる。例えば吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲルろ過法、ゲル浸透クロマトグラフィー、濾紙電気泳動法、濾紙クロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー、有機溶媒(例えばアルコール、アセトン等が好ましい)による分画、あるいは

これらの組み合わせ等の操作により行うことができるが、これらに限定されるものではない。

【0051】なお、G b 4糖鎖は必ずしも細胞から分離、精製する必要はなく、G b 4糖鎖が細胞表面に発現した細胞自体を所望の場合は、培養物中の細胞を採取してそのまま用いることもできる。

【0052】製造されたG b 4糖鎖は、前記の「本発明G b 4製造方法1」に記載の方法と同様に確認することができる。また、G b 4糖鎖が細胞表面に発現された細胞における当該G b 4糖鎖を確認する場合は、抗体等を用いて、フローサイトメトリー等の手法により行うことができる。

【0053】(3)本発明フォルスマン製造方法

本発明フォルスマン製造方法は、下記(a)又は(b)に示すDNAと、フォルスマン抗原合成酵素をコードするcDNAとを共にG b 3糖鎖発現細胞に導入し、次いで該細胞を生育させる工程を少なくとも含む、フォルスマン抗原糖鎖の製造方法である。

(a) 配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基番号109~1101からなる塩基配列を含むDNA。

(b) 配列番号1に記載の塩基配列もしくは同塩基配列に相補的な塩基配列又はこれらの塩基配列の一部を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA。

【0054】ここで(b)に示すDNAは、G b 4合成酵素活性を有するポリペプチドをコードしているものであることが好ましい。(a)又は(b)で示されるDNAの説明、用いる宿主細胞、DNAをG b 3糖鎖発現細胞に導入する方法、その際に用いるベクター、DNAが導入された細胞を生育させる方法等は、前記した「本発明酵素製造方法」と同様である。本発明フォルスマン製造方法は、フォルスマン抗原合成酵素をコードするcDNAを、(a)又は(b)で示されるDNAと共に宿主細胞に導入する点に特徴がある。フォルスマン抗原合成酵素をコードするcDNAは公知のもの(例えば、J. Biol. Chem., 274(41), p29390-29398 (1999))を用いることができる。

【0055】上記(a)又は(b)に示すDNAと、フォルスマン抗原合成酵素をコードするcDNAとを共にG b 3糖鎖発現細胞に導入し、次いで該細胞を生育させることにより、G b 4合成酵素の作用によりG b 4糖鎖が発現し、これにフォルスマン抗原合成酵素の作用によってGalNAcが転移して $\alpha$ 1,3-結合が形成され、細胞の表面にフォルスマン抗原糖鎖が発現する。

【0056】フォルスマン抗原糖鎖の採取および、製造されたフォルスマン抗原糖鎖の確認は、前記の「本発明G b 4製造方法2」と同様に行うことができる。この際、フォルスマン抗原に対するモノクローナル抗体等を用いればよい。

【0057】<3>本発明使用



本発明使用は、G b 4 合成酵素の発現のための、下記

(a) 又は (b) に示すDNAの使用である。

(a) 配列番号 1 に記載の塩基配列のうち、塩基番号 1 0 9 ~ 1 1 0 1 からなる塩基配列を含むDNA。

(b) 配列番号 1 に記載の塩基配列もしくは同塩基配列に相補的な塩基配列又はこれらの塩基配列の一部を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA。

【0058】ここで (b) に示すDNAは、G b 4 合成酵素活性を有するポリペプチドをコードしているものであることが好ましい。(a) 又は (b) で示されるDNAの説明は、前記した「本発明酵素製造方法」と同様である。

【0059】本発明使用は、上記 (a) 又は (b) に示すDNAが、G b 4 合成酵素の発現のために使用される限りにおいて、あらゆる態様を包含する。すなわち、上記酵素活性を利用する際に上記DNAを利用するあらゆる態様が包含される。例えば、本発明酵素製造方法、本発明G b 4 製造方法2および本発明フォルスマン製造方法は、いずれも上記 (a) 又は (b) に示すDNAがG b 4 合成酵素の発現のために使用されていることから、本発明使用に包含される。またG b 4 合成酵素の発現は、生体外で行われる場合のみならず、生体内で行われる場合をも包含する。例えば、上記 (a) 又は (b) に示すDNAを生体内の細胞に導入して、生体内でG b 4 合成酵素を発現させる態様も、本発明使用に包含される。

【0060】G b 3 はペロ毒素に対するレセプターであることが知られていることから、G b 4 合成酵素をコードするDNAを細胞に導入して発現させることによってG b 3 糖鎖をG b 4 糖鎖に変換し、これによってペロ毒素の細胞への結合性を失わせることができる可能性もあり、このような実施態様も本発明使用に包含される。

【0061】

【実施例】以下に、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。しかしながら、これにより本発明の技術的範囲が限定されるべきものではない。

【0062】まず、本実施例で用いた試薬等について説明する。UDP-GalNAc、LacCer、G b 3 およびG b 4 は、シグマ(Sigma)社より購入した。GM3およびGD3は、雪印乳業株式会社より購入した。UDP-[<sup>3</sup>H]GalNAcは、NENライフサイエンスプロダクツ社(NEN Life Science Products, Inc)より入手した。抗-フォルスマン糖脂質(anti-Forssman glycolipid)モノクローナル抗体であるM1/22.25.8.HLは、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(American Type Culture Collection)から入手したハイブリドーマ(ATCC TIB-121)の培養上清から調製した。

【0063】SV40のラージT抗原の発現ベクターであるpBS-SVTは、JCRB(Japanese Cancer Rese

arch Resources Bank)より入手した。

【0064】フォルスマン抗原合成酵素(Forssman antigen synthase; FS)の発現ベクターは、pFS-35(14)のHindIII/XhoI消化断片をpCDM8(インビトロジェン社)に挿入することにより構築し、pCDM8/FSと命名した。

【0065】Gb3/CD77合成酵素の発現ベクターは、pVTR-1(J. Biol. Chem. 275, p15152-15156 (2000))のXhoI断片をpCDNA3.1(インビトロジェン社)のXhoIサイトに挿入することにより構築し、pCDNA3.1/VTR-1と命名した。

【0066】マウスの繊維芽細胞(L1細胞)は、スローン・ケタリング(Sloan-Kettering)癌センターのA. P. アルビノ(Albino)博士により恵与され、ウシ胎仔血清(fetal bovine serum; FCS)を7.5%含有する、ダルベッコの改変イーグル最小必須培地(Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium; DMEM)で培養した。L細胞は $\alpha$ 1,4-ガラクトース転移酵素活性を有しておらず、また、Gb3/CD77も発現しないが、大量のLacCerを発現する。

【0067】一過性の発現系でレシピエント細胞として用いたマウスの繊維芽細胞株(1B9)は、L細胞を、pBS-SVT(SV40のラージT抗原)およびpCDNA3.1/VTR-1(Gb3/CD77合成酵素をコードするcDNA)でトランスフェクトし、ネオマイシン(neo)耐性細胞のうち、G b 3 およびSV40ラージT抗原の発現が陽性のものをスクリーニングすることにより確立した。G b 3 およびSV40ラージT抗原の発現は、それぞれラット抗Gb3モノクローナル抗体38.13(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, p6485-6488 (1981))およびマウス抗SV40ラージT抗原モノクローナル抗体Pab101(Santa Cruz, Biotechnology, Inc)を用い、それぞれ間接免疫蛍光アッセイおよびフローサイトメトリーにより行った。安定なトランスフェクタントは、7.5% FCSおよび300  $\mu$ g/ml G418を含有するD-MEM中で培養した。

【0068】1B9は、G b 3 を大量に含有するが、G b 4 とフォルスマン抗原は無視できる程度にしか含有していないのが特徴である。

【0069】

【実施例1】<1>1, 3-N-アセチルガラクトサミン転移酵素 cDNAの発現クローニング  
成人ヒト腎臓cDNAライブラリーのプラスミド(インビトロジェン社)を、pCDM8/FSと共に、DEAE-デキストラン法(J. Biol. Chem., 267, p12082-12089 (1992))によって1B9細胞(SV40ラージT抗原およびG b 3 を発現している)にトランスフェクトした。48時間後、トランスフェクトされた細胞をトリプシン処理してはがし、ラットモノクローナル抗体 M1/22.25.8.HLと共に氷冷下で1時間インキュベートした。細胞を洗浄後、細胞をヤギ抗ラットIgM(ICN)でコートしたディッシュ(Proc.

Natl. Acad. Sci. USA, 84, p3365-3369 (1987))に播いた。panned cellからHirt抽出によってプラスミドDNAを回収し、E. coli XL-1 Blue (ストラタジーン社)を形質転換した。この工程を4回繰り返した。小規模の免疫蛍光アッセイによって、約1000個のバクテリアのコロニーが陽性として同定された。このコロニーから抽出したcDNAとpCDM8/FSとを共に1B9細胞に移入した場合にフォルスマン抗原を発現するクローンを選択した結果、3つの独立したクローンが同定された。

【0070】結果的に、異なった5'-非翻訳領域を有し、グロボシド合成酵素遺伝子と推定される2つのクローン(「タイプ1」と「タイプ2」と命名した)を同定した。エキソン-イントロン結合部における全てのイントロン配列は、GT-AGコンセンサスに合致していた。タイプ1および2ともに、オープン・リーディング・フレームのヌクレオチド配列が本質的に一致していたので、タイプ1のクローンを以後の解析に用いることとし、これをβ1,3GalNAcT-1と命名した。

#### 【0071】<2>配列の解析

クローニングされたcDNAのヌクレオチド配列は、PRISM dye terminator cyclesequencing kitおよびモデル310 DNAシーケンサー(Applied Biosystems)を用いたジデオキシヌクレオチド・ターミネーション法により決定した。アミノ酸配列およびヒドロパシー解析は、Genetyx-Macソフトウェアバージョン8.0(ソフトウェア開発)を用いて行った。β1,3GalNAcT-1のタイプ1についての配列解析結果を結果を図1に示す。AUG開始コドンの位置は、Kozakのコンセンサス配列(Cell 44, p283-292 (1986))に従って決定した。その結果、クローニングされたcDNAのヌクレオチド配列は単一のオープンリーディングフレームを有していた。図1中、推定アミノ酸配列をヌクレオチド配列の下に示した。このオープンリーディングから、331アミノ酸からなる分子量39,511のタンパク質が推定された。また推定される膜貫通疎水ドメインを下線で示し、N-結合グリコシレーションされる可能性がある部位(5箇所)は四角で囲った。ポリアデニル化シグナルも下線で示した。

【0072】驚くべきことに、このアミノ酸配列をデータベースを用いて他のcDNAと比較した結果、Amadoら(J. Biol. Chem. 273, p12770-12778 (1998))により報告されているヒトβ3GalT-3と同一であることが判明した。ヒトβ3GalT-3は、β3-ガラクトース転移酵素遺伝子ファミリーに属すると考えられてきているが、ガラクトース転移酵素活性は報告されていない。

【0073】β1,3GalNAcT-1のタイプ2についての5'-非翻訳部位のヌクレオチド配列を図2に示す。エキソン-イントロン結合を併せて示した。また、KyteとDoolittleの方法(J. Mol. Biol. 157, p105-132 (1982))により、17アミノ酸のウインドウでヒドロパシープロットを行った。結果を図3に示す。なお図3中の“Hydrophobi

city”は疎水性の程度を意味する。この結果から、アミノ末端側に、23アミノ酸残基からなる顕著な疎水性領域が1箇所存在することが示された。このことからこのタンパク質は、現在知られている他の多くのグリコシルトランスフェラーゼと同様に、II型の膜貫通トポロジ-を有していることが推定される。

#### 【0074】<3>膜抽出物の調製

80%コンフレントに達したL細胞を、DEAE-デキストラン法によって発現ベクターでトランスフェクトした。80時間後に細胞を回収し、この細胞を、1mMフェニルメチルスルフォニルフルオリドを含有する氷冷したリン酸緩衝生理食塩水中で、窒素キャビテーション装置を用いて破碎した(J. Biol. Chem., 270, p6149-6155 (1995))。核を低速の遠心分離で除去し、この上清を4℃下、100,000 x gで1時間遠心分離した。沈殿を氷冷した100mM MES緩衝液(pH 6.5)で再懸濁し、酵素源として用いた。

#### 【0075】<4>酵素アッセイ

β1, 3-N-アセチルガラクトサミン転移酵素アッセイは、10mM MnCl<sub>2</sub>、0.3% Triton X-100、100mM MES緩衝液(pH6.5)、0.1mM UDP-[<sup>3</sup>H]GalNAc (160dpm/pmol: GalNAcの供与体)、200μgの下記膜抽出物、および20μgの基質(受容体)を含む混合液(全量50μl)中で行った。37℃で3時間インキュベートした後、0.5mlの水を添加することによって酵素反応を停止させた。生成物をC18 Sep-Pakカートリッジ(Waters社)を用いて単離し、alminium-backed シリカゲル-60 HPTLCプレート(メルク社)にスポットし、クロロホルム/メタノール/水(65:25:5)の溶媒系で展開することにより、薄層クロマトグラフィー(TLC)を行った。その後プレートを乾燥させ、En<sup>3</sup>Hance™ (NEN Life Science Products社)でスプレーし、放射線標識された産物をオートラジオグラフィーによって可視化した。なお、TLCにおける移動度のスタンダードとしては、LacCer、Gb3およびGb4を用いた。

【0076】膜抽出物として、pCDNA3.1ベクター(コントロール)、またはpCDNA3.1ベクターに挿入したβ1,3GalNAcT-1(pCDNA3.1/β1,3GalNAcT-1)でトランスフェクトしたL細胞からの膜抽出物を用い、基質(受容体)としてGb3糖脂質を用いてアッセイした。その結果、この酵素は[<sup>3</sup>H]GalNAcをGb3に有効に転移(79pmol/時間/mgタンパク質)し、スタンダードであるGb4と同じ移動度の新たな成分を生成することが明らかとなった。一方、基質(受容体)として種々の糖脂質(LacCer、GM3、GD3またはGb4)を用いてアッセイした結果、[<sup>3</sup>H]GalNAcは、LacCer、GM3、GD3およびGb4には転移されなかった。このことから、この酵素はGA2/GM2/GD2合成酵素やフォルスマン抗原合成酵素とは異なることが示された。なお、pCDNA3.1ベクター(コントロール)をトランスフェクトした細胞の抽出物では、活性は検出されなかった。

#### 【0077】<5>糖脂質の抽出

10

20

30

40

50

(10)

17

糖脂質は、Biochemistry 24, p7820-7826 (1985)に記載の方法で単離した。すなわち、pCDNA3.1のみでトランスフェクトされた1B9細胞、またはpCDNA3.1/ $\beta$ 1,3GalNAcT-1でトランスフェクトされた1B9細胞(いずれもバックされた状態で約0.24ml)から、クロロホルム/メタノール(2:1、1:1、1:2の順)を用いて脂質を抽出した。アセチル化した後、フロリジル(Florisil)カラムを用いて糖脂質画分を単離した。脱アセチル化および脱塩した後、全糖脂質をクロロホルム/メタノール(2:1)に溶解し、TLCプレートにスポットした。ヒトB赤血球細胞から抽出した中性糖脂質、およびGb4も同様にスポットし、展開後、オルシノール(orcino)またはプリムリン(primulin)をスプレーしてバンドを検出した結果、ヒトB赤血球細胞から抽出した中性糖脂質をスポットしたレーンにおいては、Gb4の移動位置に極めて濃いバンドが、LacCerおよびGb3の移動位置には中程度のバンドが検出された。Gb4をスポットしたレーンにはGb4の移動位置にのみ濃いバンドが検出された。

【0078】pCDNA3.1のみでトランスフェクトされた1B9細胞から抽出した糖脂質をスポットしたレーンにおいては、Gb3の移動位置にのみバンドが検出された。pCDNA3.1/ $\beta$ 1,3GalNAcT-1でトランスフェクトされた1B9細胞から抽出した糖脂質をスポットしたレーンにおいては、Gb3およびGb4の移動位置にバンドが検出された。

#### 【0079】<6>TLC-免疫染色

TLC-免疫染色は、Anal. Biochem. 221, p312-316 (1994)に記載の方法に従い、Biochemistry 24, p7820-7826 (1985)に記載の方法で行った。すなわち、上記と同様に脂質を抽出してTLCプレートにスポットして展開した後、TLCプレートをポリビニルデンジフルオリド膜にヒート・ブロット(heat-blot)した。この膜を、1:100希釈したヒト抗Gb4モノクローナル抗体(9H6)と共に1時間インキュベートして洗浄した後、ビオチン化ヤギ抗ヒトIgM(シグマ社)と共に1時間インキュベートした。抗体の結合は、ABC-PO<sup>TM</sup> (ベクター社)およびHRP-1000<sup>TM</sup> (コニカ)を用い、これらの説明書に従って検出した。Gb4をスポットしたレーン、ヒトB赤血球細胞から抽出した中性糖脂質をスポットしたレーン、およびpCDNA3.1/ $\beta$ 1,3GalNAcT-1でトランスフェクトした1B9の抽出物をスポットしたレーンには、Gb4に相当する移動位置にのみバンドが検出された。

【0080】これに対し、LacCerをスポットしたレーン、Gb3をスポットしたレーン、およびpCDNA3.1のみでトランスフェクトした1B9の抽出物をスポットしたレーンでは、バンドは全く検出されなかった。これらのことから、pCDNA3.1/ $\beta$ 1,3GalNAcT-1でトランスフェクトした1B9の抽出物をスポットしたレーンに現れたバンドは、Gb4であることが確認された。

#### 【0081】<7>フローサイトメトリー解析

DEAE-デキストラン法により、1B9細胞をpCDNA3.1、pCDNA3.1/ $\beta$ 1,3GalNAcT-1、pCDM8/FS、またはpCDNA3.1/ $\beta$ 1,3GalNAcT-1とpCDM8/FSで一過性にトランスフェクトした。2日後に細胞をAb M1/22.25.8.HLと共にインキュベートし、次いでフルオレセインイソチオシアネート結合ヤギ抗ラットIgM(薄い線で示す)で染色し、フォスマン抗原の発現の程度をフローサイトメトリーで解析した。結果を図4に示す。なお図4中の濃い線は、二次抗体のみを反応させたコントロールを示す。また、図4中の“MOCK”、“ $\beta$ 1,3GalNAc-T”、“FS”および“ $\beta$ 1,3GalNAc-T+FS”は、それぞれ、pCDNA3.1、pCDNA3.1/ $\beta$ 1,3GalNAcT-1、pCDM8/FS、およびpCDNA3.1/ $\beta$ 1,3GalNAcT-1とpCDM8/FSでトランスフェクトしたものであることを示す。また図4中、Relative fluorescence intensity”は、相対蛍光強度を意味する。

【0082】この結果、pCDNA3.1/ $\beta$ 1,3GalNAcT-1とpCDM8/FSと共にトランスフェクトした細胞、すなわちGb4合成酵素をコードするcDNAとフォスマン抗原合成酵素をコードするcDNAと共に導入した1B9細胞にのみ、フォスマン抗原の明確な発現が見られた。 $\beta$ 1,3GalNAcT-1またはpCDM8/FSを単独で導入した場合には、いずれもフォスマン抗原の発現は見られなかった。これらのデータから、 $\beta$ 1,3GalNAcT-1はGb4の発現に必要であることが示された。

#### 【0083】ノーザンブロッティング

Multiple Choice<sup>TM</sup> ノーザンブロットメンブレン (Origene Technologies社)、並びにヒトの脳、結腸、心臓、腎臓、肝臓、肺、筋肉、胎盤、小腸、脾臓、胃および精巣のポリ(A)<sup>+</sup>RNA(2 $\mu$ g)を用いて、ノーザンブロッティングを行った。ハイブリダイズは、[<sup>32</sup>P]dCTPラベルした $\beta$ 1,3GalNAcT-1のcDNAプローブ(配列番号1の塩基番号1~818で示される配列からなる)または、アクチンのプローブ(コントロール)を用いて行った。

【0084】この結果、脳および心臓において強い遺伝子発現が見られた。また中程度の発現が肺、胎盤および精巣で見られ、弱い発現が腎臓、肝臓、脾臓および胃で見られた。

#### 【0085】

【発明の効果】本発明により、新規なGb4合成酵素の製造方法、Gb4糖鎖の製造方法およびフォスマン抗原糖鎖の製造方法等が提供される。本発明酵素製造方法は、Gb4合成酵素の大量調製に有用であり、またこれにより製造されたGb4合成酵素は本発明Gb4製造方法に利用できることから極めて有用である。本発明Gb4製造方法および本発明フォスマン製造方法は、これらのグロブ系糖脂質の大量調製に有用である。また本発明使用は、Gb4合成酵素をコードするDNAを、Gb4合成酵素発現のために使用する方法である。本発明使用によれば、例えばGb4合成酵素をコードするDNAを細胞に導入して発現させることによってGb3糖鎖

(ペロ毒素に対するレセプター) を G b 4 糖鎖に変換 \* ことができる可能性もある。  
し、これによってペロ毒素の細胞への結合性を失わせる \* 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

生化学工業株式会社

古川 鋼一

<120>  $\beta$  1, 3-N-アセチルガラクトサミン転移酵素の製造方法

&lt;130&gt; J200002500

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 2

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1897

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (109)..(1104)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; N\_region

&lt;222&gt; (322)..(330)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; N\_region

&lt;222&gt; (568)..(576)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; N\_region

&lt;222&gt; (700)..(708)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; N\_region

&lt;222&gt; (742)..(750)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; N\_region

&lt;222&gt; (1084)..(1092)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; polyA\_signal

&lt;222&gt; (1157)..(1162)

&lt;400&gt; 1

gtagatagtc agatgtcttt tgaaaatgtg ttttcggtgt ggaatattaa cccaatcttt 60  
gataactctt ccagaacctt cggctcgcgt gcttctgagc tgctgtgg atg gcc tcg 117  
Met Ala Ser

1

gct ctc tgg act gtc ctt ccg agt agg atg tca ctg aga tcc ctc aaa 165  
Ala Leu Trp Thr Val Leu Pro Ser Arg Met Ser Leu Arg Ser Leu Lys

5

10

15

tgg agc ctc ctg ctg ctg tca ctc ctg agt ttc ttt gtg atg tgg tac 213  
Trp Ser Leu Leu Leu Leu Ser Leu Leu Ser Phe Phe Val Met Trp Tyr

20

25

30

35

ctc agc ctt ccc cac tac aat gtg ata gaa cgc gtg aac tgg atg tac 261  
Leu Ser Leu Pro His Tyr Asn Val Ile Glu Arg Val Asn Trp Met Tyr

21 40 45 50 22  
 ttc tat gag tat gag ccg att tac aga caa gac ttt cac ttc aca ctt 309  
 Phe Tyr Glu Tyr Glu Pro Ile Tyr Arg Gln Asp Phe His Phe Thr Leu  
 55 60 65  
 cga gag cat tca aac tgc tct cat caa aat cca ttt ctg gtc att ctg 357  
 Arg Glu His Ser Asn Cys Ser His Gln Asn Pro Phe Leu Val Ile Leu  
 70 75 80  
 gtg acc tcc cac cct tca gat gtg aaa gcc agg cag gcc att aga gtt 405  
 Val Thr Ser His Pro Ser Asp Val Lys Ala Arg Gln Ala Ile Arg Val  
 85 90 95  
 act tgg ggt gaa aaa aag tct tgg tgg gga tat gag gtt ctt aca ttt 453  
 Thr Trp Gly Glu Lys Lys Ser Trp Trp Gly Tyr Glu Val Leu Thr Phe  
 100 105 110 115  
 ttc tta tta ggc caa gag gct gaa aag gaa gac aaa atg ttg gca ttg 501  
 Phe Leu Leu Gly Gln Glu Ala Glu Lys Glu Asp Lys Met Leu Ala Leu  
 120 125 130  
 tcc tta gag gat gaa cac ctt ctt tat ggt gac ata atc cga caa gat 549  
 Ser Leu Glu Asp Glu His Leu Leu Tyr Gly Asp Ile Ile Arg Gln Asp  
 135 140 145  
 ttt tta gac aca tat aat aac ctg acc ttg aaa acc att atg gca ttc 597  
 Phe Leu Asp Thr Tyr Asn Asn Leu Thr Leu Lys Thr Ile Met Ala Phe  
 150 155 160  
 agg tgg gta act gag ttt tgc ccc aat gcc aag tac gta atg aag aca 645  
 Arg Trp Val Thr Glu Phe Cys Pro Asn Ala Lys Tyr Val Met Lys Thr  
 165 170 175  
 gac act gat gtt ttc atc aat act ggc aat tta gtg aag tat ctt tta 693  
 Asp Thr Asp Val Phe Ile Asn Thr Gly Asn Leu Val Lys Tyr Leu Leu  
 180 185 190 195  
 aac cta aac cac tca gag aag ttt ttc aca ggt tat cct cta att gat 741  
 Asn Leu Asn His Ser Glu Lys Phe Phe Thr Gly Tyr Pro Leu Ile Asp  
 200 205 210  
 aat tat tcc tat aga gga ttt tac caa aaa acc cat att tct tac cag 789  
 Asn Tyr Ser Tyr Arg Gly Phe Tyr Gln Lys Thr His Ile Ser Tyr Gln  
 215 220 225  
 gag tat cct ttc aag gtg ttc cct cca tac tgc agt ggg ttg ggt tat 837  
 Glu Tyr Pro Phe Lys Val Phe Pro Pro Tyr Cys Ser Gly Leu Gly Tyr  
 230 235 240  
 ata atg tcc aga gat ttg gtg cca agg atc tat gaa atg atg ggt cac 885  
 Ile Met Ser Arg Asp Leu Val Pro Arg Ile Tyr Glu Met Met Gly His  
 245 250 255  
 gta aaa ccc atc aag ttt gaa gat gtt tat gtc ggg atc tgt ttg aat 933  
 Val Lys Pro Ile Lys Phe Glu Asp Val Tyr Val Gly Ile Cys Leu Asn  
 260 265 270 275  
 tta tta aaa gtg aac att cat att cca gaa gac aca aat ctt ttc ttt 981  
 Leu Leu Lys Val Asn Ile His Ile Pro Glu Asp Thr Asn Leu Phe Phe  
 280 285 290  
 cta tat aga atc cat ttg gat gtc tgt caa ctg aga cgt gtg att gca 1029  
 Leu Tyr Arg Ile His Leu Asp Val Cys Gln Leu Arg Arg Val Ile Ala

23 24

295 300 305

gcc cat ggc ttt tct tcc aag gag atc atc act ttt tgg cag gtc atg 1077  
Ala His Gly Phe Ser Ser Lys Glu Ile Ile Thr Phe Trp Gln Val Met

310 315 320

cta agg aac acc aca tgc cat tat taa cttcacattc tacaaaaagc 1124  
Leu Arg Asn Thr Thr Cys His Tyr

325 330

ctagaaggac aggatacttt gtggaagtg ttaaataaag taggtactgt ggaaaattca 1184  
tgaggaggtc agtgtgctgg cttacactga actgaaactc atgaaaaacc cagactggag 1244  
actggagggt tacacttggt atttattagt caggcccttc aaagatgata tgtggaggaa 1304

ttaaataaa aggaattgga ggtttttgct aaagaaatta ataggaccaa acaatttgga 1364  
catgtcattc ttagactag aatttcttaa aagggtgtta ctgaattata agtcactag 1424  
gctgtaaaa caaaacaatg tagagtttta ttattgaac aatgtagtca cttgaagggt 1484  
ttgtgtatat cttatgtgga ttaccaattt aaaaatatat gtagttctgt gtcaaaaaac 1544  
ttcttactg aagttatact gaacaaaatt ttacctgttt ttggtcattt ataaagtact 1604  
tcaagatgtt gcagtatttc acagttatta ttatttaaaa ttacttcaac tttgtgtttt 1664  
taaatgtttt gacgatttca atacaagata aaaaggatag tgaatcattc tttacatgca 1724  
aacattttcc agttacttaa ctgatcagtt tattattgat acatcactcc attaatgtaa 1784  
agtcataagg cattattgca catcagtaat ctcttggtact ttgttaataa ttttactgtg 1844  
gtaatataga gaagaattaa agcaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa 1897

<210> 2  
<211> 331  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 2

Met Ala Ser Ala Leu Trp Thr Val Leu Pro Ser Arg Met Ser Leu Arg  
1 5 10 15

Ser Leu Lys Trp Ser Leu Leu Leu Ser Leu Leu Ser Phe Phe Val  
20 25 30

Met Trp Tyr Leu Ser Leu Pro His Tyr Asn Val Ile Glu Arg Val Asn  
35 40 45

Trp Met Tyr Phe Tyr Glu Tyr Glu Pro Ile Tyr Arg Gln Asp Phe His  
50 55 60

Phe Thr Leu Arg Glu His Ser Asn Cys Ser His Gln Asn Pro Phe Leu  
65 70 75 80

Val Ile Leu Val Thr Ser His Pro Ser Asp Val Lys Ala Arg Gln Ala  
85 90 95

Ile Arg Val Thr Trp Gly Glu Lys Lys Ser Trp Trp Gly Tyr Glu Val  
100 105 110

Leu Thr Phe Phe Leu Leu Gly Gln Glu Ala Glu Lys Glu Asp Lys Met  
115 120 125

Leu Ala Leu Ser Leu Glu Asp Glu His Leu Leu Tyr Gly Asp Ile Ile  
130 135 140

Arg Gln Asp Phe Leu Asp Thr Tyr Asn Asn Leu Thr Leu Lys Thr Ile  
145 150 155 160

Met Ala Phe Arg Trp Val Thr Glu Phe Cys Pro Asn Ala Lys Tyr Val  
165 170 175

Met Lys Thr Asp Thr Asp Val Phe Ile Asn Thr Gly Asn Leu Val Lys

25																			
180						185						190							
Tyr	Leu	Leu	Asn	Leu	Asn	His	Ser	Glu	Lys	Phe	Phe	Thr	Gly	Tyr	Pro				
195							200						205						
Leu	Ile	Asp	Asn	Tyr	Ser	Tyr	Arg	Gly	Phe	Tyr	Gln	Lys	Thr	His	Ile				
210						215						220							
Ser	Tyr	Gln	Glu	Tyr	Pro	Phe	Lys	Val	Phe	Pro	Pro	Tyr	Cys	Ser	Gly				
225						230						235						240	
Leu	Gly	Tyr	Ile	Met	Ser	Arg	Asp	Leu	Val	Pro	Arg	Ile	Tyr	Glu	Met				
245							250						255						
Met	Gly	His	Val	Lys	Pro	Ile	Lys	Phe	Glu	Asp	Val	Tyr	Val	Gly	Ile				
260						265						270							
Cys	Leu	Asn	Leu	Leu	Lys	Val	Asn	Ile	His	Ile	Pro	Glu	Asp	Thr	Asn				
275							280						285						
Leu	Phe	Phe	Leu	Tyr	Arg	Ile	His	Leu	Asp	Val	Cys	Gln	Leu	Arg	Arg				
290						295						300							
Val	Ile	Ala	Ala	His	Gly	Phe	Ser	Ser	Lys	Glu	Ile	Ile	Thr	Phe	Trp				
305						310						315						320	
Gln	Val	Met	Leu	Arg	Asn	Thr	Thr	Cys	His	Tyr									
325						330													

### 【図面の簡単な説明】

【図1】  $\beta$ 1,3GalNAcT-1(Gb4合成酵素)のタイプ1  
 についての配列解析結果を示す図である。

【図2】  $\beta$ 1,3GalNAcT-1(Gb4合成酵素)のタイプ2  
 についての5'-非翻訳部位のヌクレオチド配列を示す図

\* である。

【図3】 Gb4合成酵素の推定アミノ酸配列のハイドロパシープロットを示す図である。

【図4】 1B9細胞に各種DNAを導入した場合の、  
フォルスマン抗原の発現の程度を示す図である。

【図 1】

[illegible]



